



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**DISMINUCION DE LA RESPUESTA INMUNITARIA PROTECTORA CONTRA  
SALMONELLA TYPHIMURIUM QUE EXPRESA LIPOPOLISACARIDOS CON  
CAMBIOS ESTRUCTURALES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

**EMILIANO HISAKI ITAYA**

MEXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO**

Presidente: Dr. Constantino III Roberto López Macías.

Vocal: Dr. Jorge Fernando Paniagua Solís.

Secretario: Dr. Luis Angel Maldonado Manjarrez.

1er. Suplente: Dr. Santiago Avila Ríos.

2o. Suplente: Dra. Cristina del Carmen Gil Cruz.

El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación en Inmunoquímica (UIMIQ) del Hospital de Especialidades del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Dr. Constantino III Roberto López Macías

ASESOR DEL TEMA

M. en C. Christian Iván Pérez Shibayama.

SUPERVISOR TÉCNICO

Emiliano Hisaki Itaya

SUSTENTANTE.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Armando Isibasi por darme la oportunidad de participar en este trabajo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.

Al Dr. Constantino López por su confianza, constante apoyo y consejos.

A Christian Shibayama y Cristina Gil por ser mis asesores y compañeros de trabajo desde el momento que ingrese a la Unidad de Investigación, por su apoyo en todo momento.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica por aceptarme en este excelente equipo de trabajo pero sobre todo por su amistad incondicional.

A la Dra. Ingeborg Becker, Al Sr. Ricardo Vargas Orozco y el MVZ Daniel Sánchez Almaraz de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, por las invaluable facilidades prestadas y colaboración para el presente trabajo con animales.

El presente proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): proyecto 45261-M, 43911-M, SALUD-2004-C01-132, SALUD-2007-C01-69779, otorgados al Dr. Constantino López Macías, El Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyectos IN224907 y IN214302, otorgados al Dr. Rodolfo Pastelín Palacios, el Fondo para el Fomento de la Investigación en Salud del IMSS proyecto 2005/1/I/039 otorgado al Dr. Rodolfo Pastelín Palacios y FIS/IMSS/PROT/C2007/049 otorgado al Dr. Constantino López Macías.

## **DEDICATORIAS.**

A mis padres por su cariño y apoyo incondicional. Gracias a ustedes he completado una etapa importante de mi vida con éxito. A mis hermanos, por ustedes seguiré creciendo y madurando, para ser su orgullo y ejemplo a seguir. Como hermano mayor me siento muy contento de tenerlos siempre cerca. Los quiero familia.

Al Dr. Isibasi por todo su apoyo, conocimiento académico y de vida me inspiran día a día plantearme metas y llegar a ser “fuera de serie” como usted y toda la UIMIQ. Muchas gracias.

Al Dr. Constantino por confiar y exigirme en el trabajo. Es una gran persona con la que uno puede contar en todo momento. “Nada es imposible”.

A la UIMIQ, porque siempre fueron muy amables conmigo, y demostraron que más que un equipo de trabajo, somos amigos. Al Dr. Pastelin, Christian y Cristina, mis queridos profesores, supervisores, compañeros de laboratorio y amigos. Les agradezco mucho todo el apoyo, tiempo y formación que me han dado, se que les he costado mucho esfuerzo. Los admiro mucho por ser excelentes investigadores y maravillosas personas.

## INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN .....	9
MARCO TEORICO.....	10
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium .....	10
<i>S. typhimurium</i> Y RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO.....	10
MECANISMOS DE VIRULENCIA DE <i>S. typhimurium</i> .....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES .....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
CEPAS BACTERIANAS .....	24
CRECIMIENTO DE LAS CEPAS.....	24
INMUNIZACION DE RATONES CON LAS DIFERENTES CEPAS DE <i>S.</i> <i>typhimurium</i> .....	24
PREPARACIÓN DE ANTIGENOS PARA EL ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN FASE SÓLIDA (ELISA).....	25
DETERMINACIÓN DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS TOTALES POR ELISA. .....	26
DETERMINACIÓN DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS DE ALTA AVIDEZ ....	27
DETERMINACIÓN DE LA GENERACIÓN DE PROTECCIÓN .....	28
RESULTADOS .....	29
LA AVIDEZ DE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS FRENTE A <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> SE VE DISMINUIDA POR LOS LPS CON CAMBIOS ESTRUCTURALES .....	29

<b>LA GENERACIÓN DE PROTECCIÓN FRENTE A <i>S. typhimurium</i> SE VE DISMINUIDA POR LOS LPS CON CAMBIOS ESTRUCTURALES .....</b>	<b>32</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
210	<i>S. typhimurium</i> tipo silvestre.
430	<i>S. typhimurium</i> que expresa PhoP constitutiva y PmrA deficiente (PhoP <sup>c</sup> y PmrA <sup>-</sup> ) lo cual induce la adición de ácido palmítico al lípido A.
435	<i>S. typhimurium</i> que expresa LPS PmrA constitutiva (PmrA <sup>c</sup> ) presenta la adición de amino arabinosa en el lípido A.
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BCR	Receptor del Linfocito B
CAMPS	Péptidos Catiónicos Antimicrobianos
DC	Células Dendríticas
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida
HCl	Ácido clorhídrico
HEV	Vénulas del Endotelio alto
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
IFN-γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
iNOS	Oxido Nítrico Sintasa inducible
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
KDO	Ácido 3-desoxi-2-octulosóico
LAM	Lipoarabinomanana
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
LT	Ácidos Lipoteicóicos



NF- $\kappa$ B	Factor Nuclear kappa de cadena ligera de Linfocitos B activados
OPD	Orto-fenilendiamina
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PG	Péptido Glicano
pH	Potencial de H <sup>+</sup>
PRRs	Receptores de Reconocimiento de Patrón
RPM	Revoluciones por minuto
SAC	Solución Amortiguadora de Carbonatos
SAC	Solución Amortiguadora de Citratos
SHM	Hipermutación Somática
SSI	Solución Salina Isotónica
TCR	Receptor de Linfocitos T
TLRs	Receptores similares a Toll
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
TTSS	Sistema de secreción tipo III
UFC	Unidad Formadora de Colonia
WT	Tipo Silvestre

## RESUMEN

*Salmonella typhimurium* cuenta con los sistemas PhoP-PhoQ (PhoP/Q) y PmrA-PmrB (PmrA/B) que en medios hostiles, le permiten a la bacteria llevar a cabo modificaciones estructurales al lípido A de su lipopolisacárido (LPS) que le ayudan a defenderse de la respuesta del hospedero. Previamente se ha reportado que éstas diferencias estructurales en los LPS disminuyen la activación de la respuesta inmune innata y que promueven una disminución en los títulos de anticuerpos y la capacidad opsonofagocítica de éstos frente a la bacteria. Sin embargo, no se conocen las características de aspectos moleculares importantes de esta respuesta como lo es la avidéz de estos anticuerpos a su antígeno específico. En este trabajo se reporta que las cepas de *S.typhimurium* que expresan LPS con cambios estructurales disminuyen la avidéz de los anticuerpos inducidos contra la bacteria comparado con lo que produce la cepa silvestre, así como la generación de protección frente a la infección con una cepa atenuada de *S. typhimurium*. Los resultados indican que los LPS *S. typhimurium* que presentan cambios estructurales forman parte de mecanismos importantes de evasión del sistema inmune, disminuyendo la respuesta de anticuerpos inducidos, en específico a la avidéz e induciendo una menor generación de protección, lo cual favorecerá su supervivencia.

## MARCO TEORICO

### ***Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

El género *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pertenece a la familia Enterobacteriaceae, causante de una enfermedad parecida a la fiebre tifoidea en el ratón [1] y desencadena una serie de reacciones que al final conducen a cuadros de diarrea en el humano. [2] Es un bacilo no esporulado, Gram-negativo, móvil, con flagelos peritricos mide dos a tres micras, anaerobio facultativo, intracelular, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es lactosa y sacarosa negativos además de producir ácido sulfhídrico, presenta moléculas en su membrana de importancia biológica como el LPS (Romero Cabello, R. *Microbiología y Parasitología Humana*, pp. 298-305. Editorial médica Panamericana. México, 1999) [3]

El LPS es molécula compleja anfipática que presenta una arquitectura común que comprende tres regiones: lípido A, core y antígeno O. El lípido A, es la región con importancia biológica relacionada con infecciones por bacterias Gram negativas, como el shock endotóxico.

### ***S. typhimurium* Y RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDERO**

Generalmente *S. typhimurium* entra al organismo por ingesta de agua alimentos y contaminados con la bacteria. Ésta tiene que resistir los pH ácidos del estómago, mediante mecanismos de evasión, antes de ingresar al epitelio intestinal.

El epitelio intestinal es la primera barrera, el cual invade y atraviesa a nivel de íleon y colon por varias vías. Utiliza vellosidades o células M en las placas de Peyer como puerta de entrada, también puede ser captada en el lumen del intestino por células dendríticas y puede inducir fagocitosis en enterocitos [4]

El contacto entre *S. typhimurium* y las células fagocíticas provoca la internalización de la bacteria a través de macropinocitosis. Las células

fagocíticas activan mecanismos para poder eliminar a la bacteria mediante una fase inicial dependiente del sistema NADPH oxidasa, seguida de una fase nitrosativa, usa productos tóxicos del estallido respiratorio, enzimas bacteriolíticas tales como la lisozima y la fosfolipasa A2; los componentes terminales del sistema del complemento y péptidos antimicrobianos que alteran la membrana de la bacteria. [5] Los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPS) son un grupo abundante y diverso de moléculas que son producidas por diferentes tejidos y tipos celulares. Su composición de aminoácidos, anfipaticidad, carga catiónica y tamaño permiten a éstos insertarse en membranas para formar poros. [6] *S.typhimurium* en respuesta produce enzimas antioxidantes, sistemas de reparación, etc. Por lo que logra sobrevivir dentro del fagosoma e incluso multiplicarse dentro de él.

Por otra parte el sistema inmune innato consta de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) que reconocen Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), los cuales son altamente conservados y algunos son esenciales para la supervivencia de microorganismos. [7]

Los PRRs intracelulares tienen la finalidad de reconocer patógenos intracelulares, como *S. typhimurium*. Los solubles tienen como función activar al complemento, opsonizar células para facilitar la fagocitosis y en algunos casos funcionan como proteínas accesorias para el reconocimiento de PAMPs por receptores transmembranales, este tipo de receptores son de gran importancia para el reconocimiento y destrucción de *S.typhimurium*.

PRRs de importancia para el reconocimiento de *S. typhimurium* son los receptores tipo Toll (TLRs), que tienen la capacidad de iniciar respuestas inflamatorias así como de participar dentro de la respuesta inmune adaptativa. Son expresados en varias macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T, y en algunas células como fibroblastos y células epiteliales.

El reconocimiento del LPS ocurre a través de un complejo receptor TLR4-MD2-CD14, [8] iniciando una cascada de señalización que permite la activación de factores de transcripción como las MAP cinasas (ERK, JNK y p38) y otros

factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B y AP-1, los cuales inducen la producción de citocinas pro inflamatorias y anti inflamatorias [9] que controlan la respuesta inmune innata y pueden dirigir el desarrollo de inmunidad adaptativa antígeno específica. [10]

Una vez que las células reconocen a *S. typhimurium* a través de sus PRRs, ocurren varios eventos como son: Fagocitosis y posterior presentación de antígeno, además de la maduración de la célula, la cual consiste entre otras cosas en un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86, CD40, moléculas de MHC para la presentación del antígeno, pérdida de su capacidad fagocítica y secreción de citocinas, todo esto para poder tener una eficiente activación de linfocitos T. El proceso de maduración además incluye un cambio en la expresión de receptores para quimiocinas [11] y moléculas de adhesión [12] permitiendo de esta manera que la DC pueda viajar del sitio de infección al órgano linfoide secundario más cercano, sitio donde se lleva a cabo la presentación de antígeno a linfocitos T.

Evidencia acumulada indica que la activación del sistema inmune innato es prerrequisito para la inducción de la inmunidad adaptativa, particularmente en la inducción de la respuesta de linfocitos T cooperadores 1 (Th1). Una respuesta funcional de linfocitos Th1 es crucial para la supervivencia a una infección con *S. typhimurium* en ratones. [13] Los Th1 se caracterizan por secretar interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

Los linfocitos T CD8+ están encargados de destruir a las células infectadas por parásitos intracelulares, como *S.typhimurium*, y esto lo llevan a cabo mediante la liberación de IFN- $\gamma$  y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), además eliminan a las células infectadas por un proceso citolítico directo mediante interacción FAS y ligando de FAS (FasL) o a nivel de caspasas dejando susceptible a la *S. typhimurium* para su posterior destrucción.

La respuesta de anticuerpos frente a *S. typhimurium* requiere la activación de los linfocitos B. Los linfocitos B pueden procesar y presentar el antígeno asociado con moléculas del MHC de clase II, lo que conlleva al reclutamiento

de linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores específicos que a través de la expresión de CD40L y la secreción de citocinas estimulan la proliferación de células B y su diferenciación pasando a ser células plasmáticas secretoras de anticuerpos mientras que otros entran a centros germinales.[14]

Los centros germinales son estructuras especializadas donde los linfocitos B llevan a cabo la expansión clonal, el cambio de isotipo por recombinación, la diversificación de los genes de anticuerpos por hipermutación somática (SHM) y la maduración de la afinidad por un proceso de selección.[15] Se cree que la selección involucra una competencia entre las células B del GC para capturar al antígeno bajo la forma de complejos inmunes en la superficie de las células dendríticas foliculares (FDCs).[16] Estas células altamente afines forman parte de los progenitores de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos de larga vida y linfocitos B de memoria de alta afinidad que mantienen la inmunidad humoral después de una infección.[17] Los linfocitos B de larga vida migran de los centros germinales hacia la médula donde puede llevar a cabo la producción de anticuerpos. [18]

Actualmente existen estudios en los que se sugiere que algunos patógenos intracelulares, como *S. typhimurium* pueden tener fases extracelulares que les confieren susceptibilidad a la respuesta inmune de anticuerpos. [19]

Los anticuerpos han demostrado tener un papel importante en la protección y generación de inmunidad. Se han descrito diferentes propiedades que determinan su capacidad protectora, como son el isotipo, la afinidad por el antígeno, capacidad neutralizante, fijación de complemento y capacidad opsonofagocítica. [20]

Anticuerpos pre-existentes con altos títulos están relacionados con protección. Por otra parte se sabe que muchos de estos poseen una gran afinidad mayor a  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . [21] La afinidad es la fuerza de unión de una molécula a otra en un sitio único, como en la unión de un fragmento de la Fab monovalente de un anticuerpo a un antígeno monovalente. [22]

La avidéz de un anticuerpo es la habilidad combinada de anticuerpos policlonales con diferentes afinidades y especificidades para unir a un antígeno. Las interacciones polivalentes entre antígeno y anticuerpo son de importancia biológica porque muchas funciones efectoras de los anticuerpos se llevan a cabo óptimamente cuando dos o más moléculas de anticuerpo se juntan por la unión a un antígeno polivalente (p. ej. la activación de complemento).

Cuando la generación de altos títulos de anticuerpos no es suficiente para inducir protección, una de las posibles causas es la baja avidéz de estos frente a su antígeno específico. [22]

### **MECANISMOS DE VIRULENCIA DE *S. typhimurium***

*S. typhimurium* tiene la capacidad de detectar cambios en el medio ambiente y responder, expresando genes que le permitan sobrevivir a los microambientes presentes en las células del sistema inmune innato que son dañinos para ella, por ejemplo, *S. typhimurium* sobrevive al ambiente fagosomal por dilución de los compuestos tóxicos lisosomales o atenuación de los factores antimicrobianos, que incluyen la acidificación del fagosoma. O a pH ácidos como el del estómago. [23]

Muchos de los genes de virulencia y supervivencia de *S. typhimurium* están agrupados dentro de las islas de patogenicidad-1 (SPI-1) y 2 (SPI-2), que codifican componentes del sistema de secreción tipo III (TTSS). El TTSS tiene una estructura parecida a una aguja y se encuentra localizada a través de la membrana interna y externa de la bacteria. A través de ésta estructura, *S. typhimurium* inyecta proteínas efectoras dentro de las células del hospedero, donde interfieren con una gran variedad de procesos celulares. [24]

*S. typhimurium* depende de 2 TTSS, el primero codificado en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) requerido para la invasión celular y manipulación células fagocíticas, [24] y otro codificado en la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) relacionado con la capacidad de proliferación intracelular en el hospedero

induciendo apoptosis para escapar de células fagocíticas y silenciar la respuesta inmune. [25]

Como se mencionó anteriormente *S. typhimurium* puede responder a ambientes agresores establecidos en los tejidos del hospedero, esto lo hace a través de sistemas de detección que regulan la expresión de genes que le permiten sobrevivir a dicho ambiente. Ejemplo de estos sistemas de detección son los sistemas reguladores de dos componentes PhoP/Q y PmrA/B.

Los sistemas PhoP/Q y PmrA/B controlan la transcripción de un grupo de aproximadamente 53 genes implicados en la síntesis de proteínas muchas de las cuales están involucradas en la virulencia y supervivencia de *S. typhimurium* dentro de macrófagos. Esta respuesta de *S. typhimurium* está relacionada al estrés, metabolismo y condiciones limitantes de supervivencia. [26] El sistema regulador PhoP/Q juega un papel importante en la resistencia a respuesta inmune innata, sin embargo, se ha visto que en cepas resistentes a polimixina B y a péptidos catiónicos es requerido un segundo sistema de dos componentes PmrA/B el cual puede ser activado por PhoP/Q mediante la proteína PmrD en respuesta a bajas concentraciones de magnesio o independientemente de PhoP/Q debido a condiciones ácidas o altas concentraciones de hierro. [27]

Para *S. typhimurium*, el sistema regulador PhoP/Q es uno de los mecanismos que actúa como sensor-cinasa y activador transcripcional, activando o reprimiendo algunos genes. [29] El sistema regulador de dos componentes PhoP/Q de *S. typhimurium* regula genes necesarios para sobrevivir intracelularmente y le confiere entre otras cosas resistencia a péptidos catiónicos antimicrobianos, al modificar estructuralmente al lípido A de su LPS.

PhoQ es una proteína integral de membrana con actividad histidina-cinasa, la cual es capaz de sensar el medio ambiente y transferir fosfatos a un residuo conservado en la parte amino terminal de PhoP, una vez fosforilado se une a un promotor específico induciendo o reprimiendo la expresión de más de 52



genes llamados *phoP* activados (*pags*) y *phoP* reprimidos (*prgs*) respectivamente. [30]

El LPS es una molécula compleja anfipática que presenta una arquitectura común que comprende tres regiones: lípido A, core y antígeno O. el lípido A es una región hidrofóbica unida a una región intermedia denominada core, seguida de una cadena específica de unidades de repetición de azúcares llamado antígeno "O". [32]

El lípido A, es la región con importancia biológica relacionada con infecciones por bacterias Gram negativas, como el shock endotóxico, además de ser el patrón molecular conservado y considerado como un Patrón molecular asociado a Patógenos (PAMPs).

Se ha observado que las variaciones en composición y estructura tridimensional del lípido A del LPS pueden activar diferencialmente vías de señalización a través de TLRs. La conformación cónica del LPS estimula células a través de TLR-4, mientras que la conformación cilíndrica del LPS desencadena producción de citocinas a través de TLR-2. [33]

El heterodímero TLR4-MD-2 posee una compleja especificidad de reconocimiento al LPS. Puede ser activado por LPS estructuralmente diferentes, y aparentemente cambios mínimos pueden disminuir o suprimir su endotoxidad.

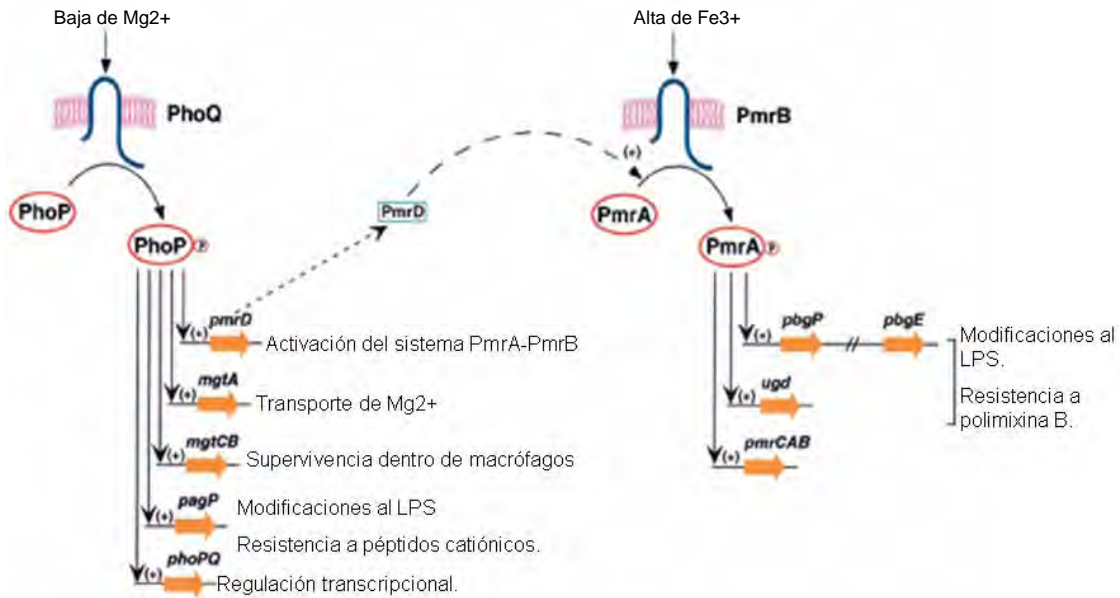
Los factores que influyen la estructura o conformación tridimensional del lípido A del LPS son el número de cadenas de ácidos grasos así como el largo de éstos, la asimetría de los ácidos grasos y la distribución de cargas negativas. [33]

Los dos grupos fosfato del lípido A afectan de manera importante a la endotoxicidad del LPS. Se ha demostrado que al quitar o modificar las cargas negativas de los grupos fosfato reduce de manera importante la potencia del LPS. [34,35] También el número total de cadenas lipídicas es un importante factor. [35,36] En un estudio se observó que el lípido A que presenta seis cadenas lipídicas induce una actividad inflamatoria óptima, mientras que uno con cinco induce una actividad 100 veces menor y un lípido A de cuatro cadenas lipídicas no tiene actividad. [37]

El análisis por espectroscopia de masas reveló que el sistema PhoP/Q de *S. typhimurium* indujo la adición de ácido 2-hidroximirístico e indirectamente de aminoarabinosa al lípido A del LPS. El lípido A modificado estructuralmente alteró la expresión de la molécula de adhesión E-selectina por células endoteliales y la expresión del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) por monocitos humanos. [30]

Estudios con cepas de *S. typhimurium* resistentes a polimixina mostraron que existen otras modificaciones al lípido A dependientes de un segundo sistema regulador llamado PmrA/B. La activación de PhoP/Q estimula la activación del sistema PmrA/B que a su vez regula la expresión del gen *pmrE*, el cual codifica para una UDP glucosa deshidrogenasa (UGD). La UGD en conjunto con enzimas codificadas en el operón *pmrHFIJKLMN* están involucradas en la producción de aminoarabinosa que al unirse al lípido A le confiere a la bacteria resistencia a algunos péptidos catiónicos y polimixina. [39]

Recientes estudios con *S. typhimurium* han descrito una proteína PmrD que puede ser el conector necesario entre los sistemas reguladores ya mencionados. Esta proteína es regulada por la activación del sistema PhoP/Q, una vez sintetizada, se une a PrmA fosforilada estabilizando esta unión y permitiendo la transcripción de los genes relacionados con PmrA. (figura 1) [28]



**Figura 1. Sistemas reguladores de dos componentes en *S. typhimurium*. Algunas señales que controlan la expresión de los sistemas PhoP/Q y PmrA/B y la interconexión de los dos sistemas. (Imagen modificada de Groisman E.A. Journal of bacteriology 2001).**

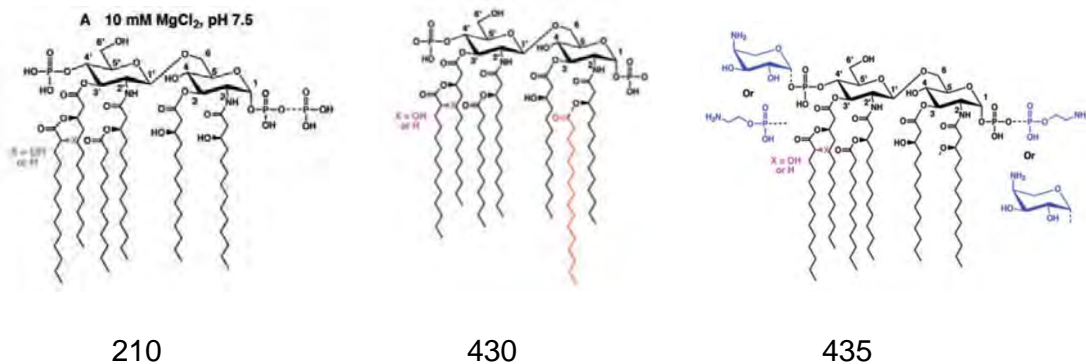
La activación de PhoP/Q por su parte, induce la expresión de PagL, la cual es una 3-O deacilasa y de PagP que es una palmitoil transferasa lo que da como resultado un lípido A modificado por la sustitución de un ácido 3-hidroximirístico por ácido palmítico. Este cambio induce una disminución de activación de NF- $\kappa$ B de 200 veces en células de ratón y humanas transfectadas con TLR-4, lo que sugiere que el reconocimiento por TLR-4 está siendo influenciado por los grados de acilación del LPS. [40].

En estudios previos se encontró que el lípido A de la cepa *S. typhimurium* WT ATCC 14028s, denominada en este trabajo 210, cambia cuando se inducen mutaciones en los operones *phoP-phoQ* o *pmrA-pmrB*. De esta se obtuvieron varias cepas, de las cuales dos son empleadas en este trabajo. [42]

La primera de ellas es la 430 que es una cepa PhoP<sup>C</sup> pmrA<sup>-</sup> que tiene la característica de presentar un lípido A heptacilado formado por un disacárido de D-glucosamina bifosforilado en 1 y 4', unidos entre sí por un enlace  $\beta$  1-6

glucosídico (GlcN II-GlcNI). Las dos glucosaminas están sustituidas por ácido 3-hidroximirístico en las posiciones 2, 3, 2', 3' y con sustituciones de grupos acilo secundarios en el hidroxilo del ácido 3-hidroximirístico en posición 3' por ácido hidroximirístico y en 2' por ácido láurico de la GlcP N II, además de una sustitución en el grupo acilo secundario con ácido palmítico en la posición 2. La segunda cepa es la 435, está adicionada en la posición 4' por una aminoarabinosa unida por un enlace fosfoéster.

Las estructuras moleculares de los LPS utilizados en el presente trabajo se muestran enseguida. (figura 2)



**Figura 2. Estructura química predominante de los diferentes LPS expresados en las cepas de *S. typhimurium* utilizadas en el presente trabajo.**

En caso de la infección por *S. typhimurium* en ratones, se ha observado que la inmunidad no se genera de manera eficiente, es decir no hay protección frente a la re-infección. [44] La inmunidad es la capacidad del sistema inmune de proteger al organismo contra la infección, esta protección está mediada, en parte, por la memoria inmunológica que es la capacidad del organismo de

responder de manera más rápida y eficiente durante la segunda exposición al antígeno. [43]

*S. typhimurium* para evadir la inmunidad adaptativa induce a la muerte por apoptosis de linfocitos T CD4 antígeno-específicos activados por mecanismos de SPI-2 [45] además modifica estructuralmente el lípido A del LPS, el cual le confiere protección frente a péptidos antimicrobianos y a ambientes hostiles. Las modificaciones al lípido A del LPS de *S. typhimurium* disminuyen la respuesta mediada por TLR, de tal manera que la activación y por consiguiente la presentación de coestimuladoras y secreción de citocinas de las APC y linfocitos B se ven disminuidas.

Por otra parte las islas de patogenicidad de la bacteria le permiten, por medio de sistemas de secreción, modificar la estructura de los órganos linfoides, desregulando la formación de los centros germinales, lo cual induce al mal funcionamiento de mecanismos como la presentación de antígeno y cooperación de linfocitos, la hipermutación somática, selección positiva-negativa y la maduración de la afinidad. [46]

Estudios recientes en el laboratorio, demuestran que los LPS con cambios estructurales de *S. typhimurium* inducen una disminución en los títulos de anticuerpos contra la bacteria y su capacidad opsonofagocítica comparados con los inducidos por la cepa silvestre. (Pastelin et. Al, comunicación personal) Sin embargo, la protección mediada por anticuerpos no depende únicamente de éstas características, existen otras de gran importancia como la avidéz a su antígeno específico. [38] Se ha observado en algunos casos que a pesar de tener títulos altos los anticuerpos no protegen, una de las posibles causas es la baja avidéz de estos frente a su antígeno específico. [22]

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Durante el proceso infeccioso *S. typhimurium* enfrenta microambientes agresivos utilizando entre otros mecanismos la modificación estructural de su LPS. Los LPS modificados estructuralmente le permiten evadir la acción de múltiple mecanismos innatos de defensa. También Se ha demostrado que estas modificaciones inducen a una disminución en la respuesta de anticuerpos y en la capacidad opsonofagocítica de los mismos. Sin embargo, no se conoce si estas modificaciones al LPS pudieran también afectar a la avidéz como una característica importante de anticuerpos protectores contra la bacteria y si estos efectos pueden afectar la generación de protección ante la infección con la cepa de tipo silvestre.

## **HIPÓTESIS**

Las cepas de *S. typhimurium* que expresan LPS con cambios estructurales inducen anticuerpos de menor avidéz, además disminuyen la generación de protección frente a la infección con la cepa de tipo silvestre.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto de las cepas mutantes de *S. typhimurium* que expresan LPS con cambios estructurales sobre la avididad de anticuerpos y protección generada frente a la cepa de tipo silvestre.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Estudiar el efecto de las cepas mutantes de *S. typhimurium* que expresan los LPS con cambios estructurales sobre la respuesta en la avididad de los anticuerpos inducidos frente a la cepa de tipo silvestre.

Evaluar la generación de protección frente a la bacteria de tipo silvestre al inmunizar con las cepas de *S. typhimurium* que expresan LPS con cambios estructurales.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **CEPAS BACTERIANAS**

Se utilizó la cepa de *S. typhimurium* ATCC 14028 (210), así como las cepas derivadas de esta que fueron mutadas para expresen modificaciones estructurales en su LPS. La cepa 430 es PhoP constitutiva y PmrA deficiente (PhoP<sup>c</sup> y PmrA<sup>-</sup>) lo cual induce la adición de ácido palmítico al lípido A. La cepa 435, es PmrA constitutiva (PmrA<sup>c</sup>) presenta la adición de amino arabinosa en el lípido A.

### **CRECIMIENTO DE LAS CEPAS**

Las cepas de *S. typhimurium* 430 y la 435 presentan cassettes de resistencia a antibióticos, contra tetraciclina y cloranfenicol respectivamente. La cepa 210 se cultivó en medio LB estéril, la cepa 430 en medio LB con Tetraciclina (15 µg/mL) y la cepa 435 en medio LB con Cloranfenicol (15 µg/mL). Se incubaron los cultivos a 37°C con agitación de 200 rpm durante 4 horas. Se verificó que la absorbancia fuera igual a  $1.0 \pm 0.01$  a 540 nm. Al obtener la absorbancia deseada, las cepas se inactivaron por calor en baño de agua a 70°C durante 1 hora 30 minutos con agitación continua. Posteriormente se sembró por estría en placa una alícuota de esta suspensión para realizar la prueba de inactivación. Inactivadas las cepas, se centrifugaron a 4000 rpm durante 40 minutos a 4°C. Se decantó el medio y se realizaron 2 lavados con PBS 1x estéril. Los lavados consistieron en re suspender el botón en el volumen que tenía de medio, centrifugar a las mismas condiciones y decantar. Se re suspendió a la bacteria inactivada en PBS 1x estéril, y se ajustó la cantidad de bacteria para obtener  $1 \times 10^9$  UFC/mL ( $A=1$  a  $\lambda=540\text{nm}$ )

### **INMUNIZACION DE RATONES CON LAS DIFERENTES CEPAS DE *S. typhimurium***

Se emplearon ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad (Bioterio de

la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM). Los ratones se alojaron en grupos de 6 individuos dentro de microaisladores. Los ratones se inmunizaron con  $5 \times 10^5$  bacterias muertas por calentamiento a  $70^\circ \text{C}$  una hora treinta minutos de las cepas 210, 430 y 435. Como control negativo se inyectaron ratones con SSI. Los ratones fueron reinmunizados con la misma dosis de antígeno 15 días posteriores a la inmunización. La obtención de la muestra de sangre se hizo con punción en la vena maxilo facial el día 30 posterior a la inmunización, la sangre se colectó en tubos Microtainer BD, se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos y se congelaron a  $-20^\circ \text{C}$  hasta la realización del ensayo inmunoenzimático.

### **PREPARACIÓN DE ANTIGENOS PARA EL ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN FASE SÓLIDA (ELISA)**

Se colocó un inóculo de la bacteria a un matraz Erlenmeyer conteniendo caldo LB y se incubó a  $37^\circ \text{C}$  y 200 rpm en un incubador con agitación el tiempo necesario para obtener una D.O de 1 a una longitud de onda de 540 nm, que equivale a  $1 \times 10^9$  bacterias. Una vez obtenido el número de bacterias se centrifuga a 3000 rpm 40 minutos y se realizan 4 lavados con PBS 1x. Se inactivó a la bacteria por calor, en baño de agua a  $70^\circ \text{C}$  durante 1 hora y treinta minutos se siembra en cajas Petri conteniendo Agar tripticasa soya para corroborar que no exista crecimiento. Se centrifugó la muestra inactivada y decantó el sobrenadante, se re suspende el botón en amortiguador de carbonatos a pH 9,5 para la posterior sensibilización de placas.

## **DETERMINACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS TOTALES POR ELISA.**

Se sensibilizaron placas de 96 pozos para inmunoensayo (Corning) con  $1 \times 10^7$  bacterias por pozo y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora y después a  $4^\circ\text{C}$  durante toda la noche.

Se lavaron las placas cuatro veces con solución PBS-Tween 20 y se bloquearon con  $200 \mu\text{L}$  de leche descremada disuelta en PBS al 5%, incubando las placas a  $37^\circ\text{C}$  por 60 minutos. Se lavaron las placas cuatro veces con solución PBS-Tween 20 y se refrigeraron hasta su utilización.

Los sueros fueron diluidos 1:40 ( $5 \mu\text{L}$  en  $195 \mu\text{L}$ ) en leche-PBS al 5% a partir de esta dilución se realizaron diluciones seriadas en factor de dos transfiriendo  $100 \mu\text{L}$  de la dilución a otro pozo que contenga  $100 \mu\text{L}$  de leche PBS hasta completar los 12 pozos de la fila de la placa de micro dilución con fondo plano, se transfirieron las diluciones a la placa para inmunoensayo sensibilizada con el antígeno correspondiente y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por una hora. Se lavaron 2 veces con PBS-Tween 20 y se adicionaron  $100 \mu\text{L}$  por pozo de PBS-Tween 20 durante 10 minutos, terminando ese tiempo se decantaron las placas y se lavaron 2 veces con PBS – Tween 20. Se colocó por pozo  $100 \mu\text{L}$  del anticuerpo anti IgG respectivo marcado con peroxidasa, diluido 1:1000 en leche-PBS, se incubó por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 y se reveló con la solución reveladora incubando en la oscuridad por 10 minutos, se detuvo la reacción adicionando  $10 \mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 2.5 N. Las placas fueron leídas en un lector de microplacas (Dynex Technologies) a 490 nm. Se determinaron los títulos de anticuerpos específicos y se graficó en forma logarítmica contra el día a que corresponda el suero.

## **DETERMINACIÓN DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS DE ALTA AVIDEZ**

Se sensibilizaron placas de 96 pozos para inmunoensayo (Corning) con  $1 \times 10^7$  bacterias por pozo y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante una hora y después a  $4^\circ\text{C}$  durante toda la noche.

Se lavaron las placas cuatro veces con solución PBS-Tween 20 y se bloquearon con 200  $\mu\text{L}$  de leche descremada disuelta en PBS al 5%, incubando las placas a  $37^\circ\text{C}$  por 1 hora. Se lavaron las placas cuatro veces con solución PBS-Tween 20 y se refrigeraron hasta su empleo.

Los sueros fueron diluidos 1:40 (5  $\mu\text{L}$  en 195  $\mu\text{L}$ ) en leche-PBS al 5% a partir de esta dilución se realizaron diluciones seriadas en factor de dos transfiriendo 100  $\mu\text{L}$  de la dilución a otro pozo que contenga 100  $\mu\text{L}$  de leche PBS hasta completar los 12 pozos de la fila de la placa de micro dilución con fondo plano, se transfirieron las diluciones a la placa para inmunoensayo sensibilizada con el antígeno correspondiente y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por una hora. Se lavaron 2 veces con PBS-Tween 20 y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo de solución de Urea 7M durante 10 minutos, terminando ese tiempo se decantaron las placas y se lavaron 2 veces con PBS – Tween 20. Se colocó por pozo 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo anti IgG respectivo marcado con peroxidasa, diluido 1:1000 en leche-PBS, se incubó por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 y se reveló con la solución reveladora incubando en la oscuridad por 10 minutos, se detuvo la reacción adicionando 10  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 2.5 N. Las placas fueron leídas en un lector de microplacas (Dynex Technologies) a 490 nm. Se determinaron los títulos de anticuerpos específicos y se graficó en forma logarítmica contra el día a que corresponda el suero.

## DETERMINACIÓN DE LA GENERACIÓN DE PROTECCIÓN

La cepa 210 de *S. typhimurium* fue crecida en 5 mL de medio LB durante 12 horas a 37°C con agitación constante de 120 rpm. Se transfirió una alícuota de 200 µL a 5 mL de medio LB para incubar por 4 horas aproximadamente bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. El contenido de bacteria se calcula por espectrofotometría ( $\lambda=540$  nm). Cuando el valor de absorbancia es 1, representa una cantidad de  $1 \times 10^9$  UFCs, al llegar a ese momento hay que colocar el tubo en un baño de hielo. A los grupos de ratones inmunizados se les infectó i.p. con  $1 \times 10^5$  UFC por mL de *S. typhimurium* 210. Se determinó la protección observando todas las características durante los 5 días posteriores a la infección.

## RESULTADOS

### LA AVIDEZ DE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS FRENTE A *Salmonella typhimurium* SE VE DISMINUIDA POR LOS LPS CON CAMBIOS ESTRUCTURALES

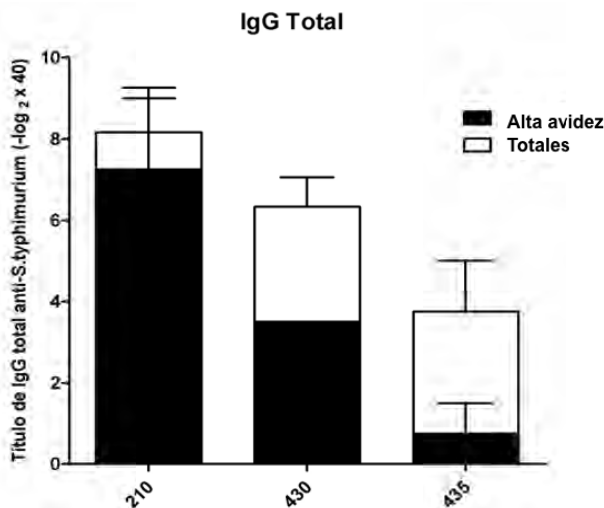
La primera pregunta planteada fue si las modificaciones estructurales de los LPS de *S. typhimurium* influyen sobre la avidéz de los anticuerpos inducidos contra la bacteria. Grupos de 6 ratones se inmunizaron al día 0 y al día 15 vía i.p. con las cepas 210, 430 y 435 inactivadas por calor. El título de anticuerpos específicos fue medido en el suero de los ratones a los 30 días posteriores a la inmunización por el método de ELISA.

Con respecto al título de anticuerpos de clase IgG, se observa que el mayor título se obtiene al inmunizar con la cepa 210 y que la inmunización con las cepas 430 y 435 inducen un título menor (2 veces menor y 4 veces menor) de anticuerpos que los inducidos por la 210, además en esta misma figura podemos observar los títulos posteriores al lavado con Urea 7M en color negro, los cuales nos indican anticuerpos de alta avidéz. Respecto a la tendencia de los anticuerpos de alta avidéz, en este trabajo se decidió el título de anticuerpos totales como un 100%, existe un mayor porcentaje de estos en los sueros de ratones inmunizados con la cepa 210, observando una diferencia significativa comparando con los anticuerpos de alta avidéz obtenidos por la cepa 435. (figura 1A).

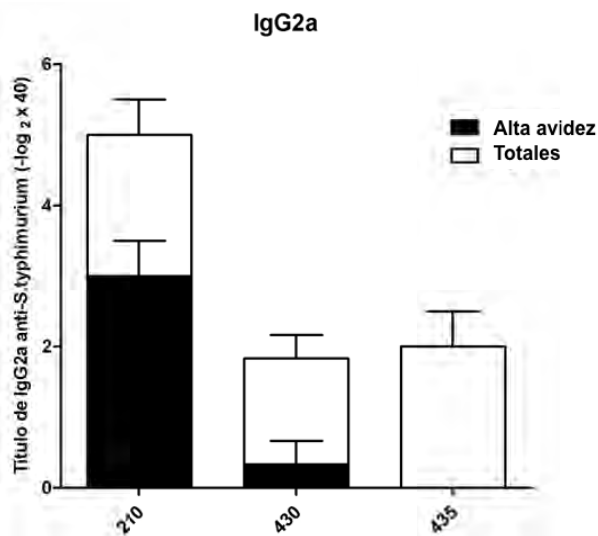
El análisis de los anticuerpos IgG2a mostró un comportamiento parecido al de IgG total ya que la cepa 210 indujo los títulos más elevados seguida por la cepa 435, mientras que la cepa 430 indujo el menor título de anticuerpos. Sin embargo los títulos de 430 y 435 casi no difieren. La presencia de estos anticuerpos fue observada únicamente durante la respuesta secundaria. De igual manera observamos que los títulos de anticuerpos de alta avidéz son mayores en los sueros de los ratones inmunizados con la cepa 210, seguido de los sueros de los inmunizados con 430 y sin títulos para aquellos inmunizados con la cepa 435. (figura 1B).

Como control negativo de la ELISA se empleó un suero de animales inmunizados con OVA y como controles positivos, de alta avidéz se empleó suero de ratón que sobrevivió a la infección con *S. typhimurium* bajo tratamiento con antibióticos y, el de baja avidéz se empleo un suero obtenido al día 4 posterior a la inmunización con *S. typhimurium*.

1A



1B



**Figura 1. Las cepas mutantes que expresan LPS modificado disminuyen la avidez de los anticuerpos inducidos frente a *S. typhimurium*.** Grupos de 6 ratones hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron inmunizados (día 0) vía i.p. con las cepas 210, 430 y 435 inactivadas por calor a 70° C y solución salina isotónica (SSI), al día 15 se reinmunizó con la misma cantidad de bacteria. Al día 30 se realizó la toma de muestra sanguínea a partir de la vena facial. Los anticuerpos con alta avidez se definieron como el título que corresponde a las placas después del lavado con la solución de Urea 7M.



Estos resultados muestran que las cepas que expresan el LPS con cambios estructurales inducen un menor título de anticuerpos y, del título total de anticuerpos la proporción que corresponde a anticuerpos de alta avidéz es menor, y con mayor diferencia con la cepa 435. Sin embargo, se sabe que tener títulos altos, así como alta avidéz de anticuerpos, no son determinantes para inducir una capacidad protectora, por lo cual nos planteamos la siguiente pregunta. ¿Se verá modificada la generación de protección por el efecto de las cepas que expresan un LPS con cambios estructurales?

### **LA GENERACIÓN DE PROTECCIÓN FRENTE A *S. typhimurium* SE VE DISMINUIDA POR LOS LPS CON CAMBIOS ESTRUCTURALES**

La segunda pregunta planteada fue si las cepas de *S. typhimurium* que expresaban LPS con cambios estructurales afectaban la generación de protección frente a la bacteria de tipo silvestre al inmunizar previamente con las cepas modificadas inactivadas. Grupos de 6 ratones hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron inmunizados (día 0) vía i.p. con las cepas 210, 430 y 435 inactivadas por calor a 70°C y solución salina isotónica (SSI). Al día 15 posterior a la inmunización se reinmunizó con la misma cantidad de bacteria. Al día 30 posterior a la inmunización se realizó el reto infectando con 10 dosis letales de *S. typhimurium* de tipo silvestre. La protección se determinó midiendo la supervivencia de los ratones en un periodo de 7 días posteriores a la infección.



**Figura 2. Las cepas que expresan LPS modificado inducen a una menor generación de protección frente a *S. typhimurium*.** Grupos de 6 ratones hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron inmunizados (día 0) vía i.p. con las cepas 210, 430 y 435 inactivadas por calor a 70°C y solución salina isotónica (SSI). Al día 15 posterior a la inmunización se reinmunizó con la misma cantidad de bacteria. Al día 30 posterior a la inmunización se realizó el reto infectando con 10 dosis letales de *S. typhimurium* de tipo silvestre. La protección se determinó midiendo el porcentaje de supervivencia de los ratones en un periodo de 7 días posteriores a la infección.

Se observa que la protección generada frente a la infección con *S. typhimurium* esta disminuida en mayor porcentaje cuando inmunizamos con 435 debido a que estan muriendo los ratones en un tiempo más corto comparado con los inmunizados con la cepa tipo silvestre. Los ratones que se les administró PBS no generan protección y mueren en un tiempo similar a los inmunizados con la cepa 435.

## DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos para la determinación del efecto de las cepas que expresan LPS con cambios estructurales sobre la avidéz, observamos que para el isotipo IgG, el porcentaje de anticuerpos de alta avidéz inducidos frente a *S. typhimurium* tipo silvestre se ve disminuido al haber inmunizado con las cepas que expresan el LPS modificado, sobre todo con la cepa 435. De la misma manera ocurrió con la subclase IgG2a, el porcentaje de los anticuerpos de alta avidéz frente a *S. typhimurium* tipo silvestre se ve disminuido al inmunizar con las cepas 430 y 435.

Estos resultados pueden deberse a una gran cantidad de variables, sin embargo el conocimiento teórico nos lleva a plantear mecanismos que pudieran estar ocurriendo, de tal manera que podemos sugerir lo siguiente.

La respuesta de anticuerpos a antígenos T-dependientes puede verse disminuida desde el reconocimiento por TLR-4 del LPS, que al ser estructuralmente diferente al de *S. typhimurium* de tipo silvestre, podría mandar una señal deficiente para la maduración de las APC, induciendo una menor expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40), las cuales, se sabe, participan en la activación de linfocitos T cooperadores. Los linfocitos T cooperadores al no tener suficiente co-estimulación, por parte de las APC y estímulos por el ambiente de citocinas, estarían disminuyendo la secreción de sus citocinas, las cuales, junto con la interacción de CD40-CD40L, activarían a los linfocitos B.

La respuesta de los linfocitos T, al ser insuficiente o inapropiado para la formación de los centros germinales, podría generar linfocitos B de memoria que no sufren hipermutación somática ni maduración de la afinidad. De esta manera puede explicarse la disminución de los títulos de anticuerpos frente a *S. typhimurium* así como la disminución de la avidéz y la disminución del cambio de anticuerpos a clase IgG.

Por otra parte, los linfocitos B, que pueden reconocer antígenos directamente en su forma nativa y activarse por medio de la señalización por TLRs, no tendrían una señalización suficiente para su óptima activación. Esto posiblemente estaría induciendo que no ocurra la migración celular a los órganos linfoides secundarios, donde la presentación de antígeno y cooperación con linfocitos T cooperadores es de suma importancia para la formación de los Centros Germinales.

Otra posibilidad que no debemos descartar es que éstos LPS con cambios estructurales podrían estar induciendo una señal de muerte celular, la cuál si ocurriera en linfocitos B y esto influye directamente en la disminución de títulos de anticuerpos.

Ésta hipótesis se refuerza con artículos donde se ha demostrado que, *Pseudomonas aeruginosa*, aprovecha las modificaciones al lípido A inducidas por los sistemas PhoP/Q para disminuir su identificación y señalización por TLR, dando como resultado una disminución en la respuesta inflamatoria, en el reclutamiento de leucocitos y disminución en el patrón de citocinas. [47]

*S. typhimurium*, también puede modificar al lípido A del LPS, disminuye la producción de citocinas inflamatorias así como óxido nítrico, explosión oxidativa, migración celular al sitio de infección y expresión de moléculas co-estimuladoras en las APC. (Pastelín et. Al, comunicación personal) Esta respuesta innata puede afectar la activación de linfocitos T y por consiguiente a los linfocitos B encargados de la producción de anticuerpos frente a la bacteria. [48]

En cuanto a la respuesta de anticuerpos, En el laboratorio se observó que no hay una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos de clase IgM inducidos por las tres cepas evaluadas, sin embargo, en la respuesta de anticuerpos IgG total, se encontró que los títulos de las subclases de IgG están disminuidos significativamente en las cepas 430 y 435 con respecto a la cepa 210 después del refuerzo, sugiriendo la participación del linfocito T en el proceso, ya que éstos pueden generar un microambiente de citocinas que

contribuye a que el linfocito B lleve a cabo el cambio de isotipo. (Pastelín et. Al, comunicación personal)

En modelos animales se ha observado que el efecto protector se ve influenciado por la subclase IgG que sea transferida, como en la infección con virus de la fiebre amarilla, los anticuerpos IgG2a son más protectores que los de subclase IgG1. [49]

Los títulos de anticuerpos representan de manera indirecta la cantidad de anticuerpos generados, sin embargo, no indican que estos induzcan lisis bacteriana, procesos de fagocitosis u otros procesos involucrados en la generación de protección, como la avidéz.

Se ha reportado en nuestro laboratorio que la capacidad opsonofagocítica, así como la de los anticuerpos se ven disminuidas por efecto que los LPS con cambios estructurales en su lípido A.

Tomando en cuenta los datos relacionados de los LPS modificados de *S. typhimurium* y lo que éstas producen sobre la respuesta inmune innata, adaptativa y de anticuerpos, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de las cepas de *S. typhimurium* que expresan LPS con cambios estructurales sobre la avidéz de anticuerpos inducidos, como una característica relacionada a la protección, así como sobre la generación de protección frente a ésta.

Los resultados del reto para determinación de la generación de protección, indican con claridad que los LPS con cambios estructurales generan una menor protección frente a la infección con *S. typhimurium* tipo silvestre.

Se sabe que la memoria inmunológica confiere inmunidad al hospedero, y que los anticuerpos juegan un papel importante en ésta. Al ver que los ratones inmunizados con la cepa 210 mueren en un periodo más largo que aquellos administrados con PBS, nos indica que existe una generación de anticuerpos,

linfocitos B de memoria y B de larga vida. Lo contrario se puede observar al inmunizar con las cepas que expresan LPS modificado.

Otra característica importante que lleva a pensar en una disminución de protección, es la disminución de la respuesta inmune innata, ya que las células necesarias para la activación y proliferación de linfocitos B no inducen suficiente estímulo.

Se ha descrito que la deficiencia en la maduración de la afinidad de anticuerpos puede ser debido a una estimulación pobre de TLR. Por otra parte se sabe que los anticuerpos de baja avidéz no protegen ya que no poseen capacidad neutralizante. [50]

Se ha publicado que la inmunidad adaptativa generada contra *S. typhimurium* es TLR4,2 y MyD88 independiente. Ratones deficientes de estas moléculas, al ser retadas con la cepa de tipo silvestre se observa supervivencia similar a la de los ratones de tipo silvestre. [13] Estos datos sugieren que el reconocimiento por TLR4 del LPS podría ser importante para modular de manera negativa a la generación de protección.

Por último, debemos destacar que *S. typhimurium* posee un sistema de evasión muy complejo y eficiente, ya que de lo específico a lo particular, una pequeña modificación en el lípido A del LPS de la membrana externa de la bacteria, induce protección contra péptidos antimicrobiano, microambientes agresivos para la supervivencia y reconocimiento por parte de la inmunidad innata, desde el reconocimiento por las APC hasta los ambientes de citocinas; y sin ser suficiente, modifica la respuesta adaptativa modulando la activación de linfocitos T y B y la producción de anticuerpos, disminuyendo su capacidad opsonofagocítica y su afinidad. Todas las características en conjunto inducen que no se genere memoria inmunológica, dejando al hospedero susceptible a la reinfección, sin matarlo, y favoreciendo la supervivencia de la bacteria.

## CONCLUSIÓN

Las cepas mutantes de *S. typhimurium* que expresan LPS con cambios estructurales inducidos por los sistemas PhoP/Q y PmrA/B disminuyen la avidéz de anticuerpos y protección generada frente a la cepa de tipo silvestre.

Las modificaciones al LPS juegan un papel importante en la supervivencia de la bacteria como un mecanismo de evasión al sistema inmune del hospedero, disminuyendo la respuesta inmune innata y consecuentemente a la adaptativa, afectando de manera negativa en la generación de anticuerpos, su avidéz y la protección que puede ser conferida por ellos.

## **ANEXO**

### **Reactivos utilizados para las determinaciones por ELISA.**

#### **Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7.4**

Pesar exactamente:

Cloruro de sodio 8.7g

Fosfato monobásico de sodio 0.7g

Fosfato dibásico de sodio 2.7g

Disolver en 500mL de agua MilliQ,

ajustar pH y llevar a volumen de 1000mL con agua MilliQ.

#### **Solución amortiguadora de Carbonatos (SAC) pH 9.5**

Pesar exactamente:

Bicarbonato de sodio 7.0 g

Carbonato de sodio 2.8 g

Disolver en 500 ml de agua MilliQ,

ajustar el pH y llevar a volumen de 1000 mL con agua MilliQ.

#### **Solución amortiguadora de citratos (SAC) pH 5.6**

Pesar exactamente:

Ácido cítrico 4.1g

Citrato de sodio 29.0g

Disolver en 500 mL de agua MilliQ,

ajustar pH y aforar con agua MilliQ a 1000mL

#### **Solución de lavado (agua Tween 0.1%)**

A cada litro de agua destilada agregar 1 mL de Tween 20 y disolver.

#### **Solución de Bloqueo (PBS + leche 5%)**

Pesar 5 g de leche descremada, agregar PBS suficiente para hacer un volumen de 100 mL.



Nota: Esta solución debe ser utilizada el mismo día en que es preparada.

### **Solución de revelado.**

Por cada 12 mL de SBC:

agregar 0.006g de OPD (SIGMA).

10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (SIGMA).

Nota: Esta solución debe utilizarse inmediatamente después de haberse preparado y debe mantenerse protegida de la luz.

### **Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N**

Medir 6.66 mL de ácido sulfúrico (98% pureza,  $\delta$  1.84) y transferir a un matraz volumétrico de 100mL con 50 mL de agua destilada, dejar enfriar y llevar al aforo con agua destilada.

## REFERENCIAS

1. Oh YK, Alpuche-Aranda C, Berthiaume E, Jinks T, Miller SI, et al. (1996) Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64: 3877-3883.
2. Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, et al. (2003) Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* 71: 1-12.
3. Mittrucker HW, Kaufmann SH (2000) Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol* 67: 457-463.
4. Niess JH, Reinecker HC (2006) Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cell Microbiol* 8: 558-564.
5. Peschel A (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 10: 179-186.
6. Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3: 238-250.
7. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
8. Miller SI, Ernst RK, Bader MW (2005) LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 3: 36-46.
9. Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511.
10. Akira S (2009) Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 143-156.
11. Santos RL, Zhang S, Tsois RM, Kingsley RA, Adams LG, et al. (2001) Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* 3: 1335-1344.
12. Kraus MD, Amatya B, Kimula Y (1999) Histopathology of typhoid enteritis: morphologic and immunophenotypic findings. *Mod Pathol* 12: 949-955.
13. Seibert SA, Mex P, Kohler A, Kaufmann SH, Mittrucker HW (2010) TLR2-, TLR4- and Myd88-independent acquired humoral and cellular immunity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Immunol Lett* 127: 126-134.

14. Batista F (2008) Facundo Batista: watching B cells spread and grab antigens. Interview by Hema Bashyam. *J Exp Med* 205: 1718-1719.
15. Xu Z, Pone EJ, Al-Qahtani A, Park SR, Zan H, et al. (2007) Regulation of *aicda* expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Crit Rev Immunol* 27: 367-397.
16. Allen CD, Okada T, Tang HL, Cyster JG (2007) Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 315: 528-531.
17. Brink R (2007) Germinal-center B cells in the zone. *Immunity* 26: 552-554.
18. Klein U, Dalla-Favera R (2008) Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8: 22-33.
19. Casadevall A (2003) Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. *Infect Immun* 71: 4225-4228.
20. Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, Freer G, Burkhart C, et al. (1997) The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 276: 2024-2027.
21. Zinkernagel RM (2002) On differences between immunity and immunological memory. *Curr Opin Immunol* 14: 523-536.
22. Polack FP, Hoffman SJ, Crujeiras G, Griffin DE (2003) A role for nonprotective complement-fixing antibodies with low avidity for measles virus in atypical measles. *Nat Med* 9: 1209-1213.
23. Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI (1994) *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 179: 601-608.
24. Waterman SR, Holden DW (2003) Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* 5: 501-511.
25. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, et al. (1999) The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2396-2401.
26. Charles RC, Harris JB, Chase MR, Lebrun LM, Sheikh A, et al. (2009) Comparative proteomic analysis of the PhoP regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhi versus Typhimurium. *PLoS One* 4: e6994.

27. Kato A, Mitrophanov AY, Groisman EA (2007) A connector of two-component regulatory systems promotes signal amplification and persistence of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12063-12068.
28. Eguchi Y, Utsumi R (2005) A novel mechanism for connecting bacterial two-component signal-transduction systems. *Trends Biochem Sci* 30: 70-72.
29. Groisman EA (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 183: 1835-1842.
30. Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, et al. (1997) Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science* 276: 250-253.
31. Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, et al. (1998) Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 95: 189-198.
32. Gronow S, Brade H (2001) Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive? *J Endotoxin Res* 7: 3-23.
33. Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Van der Meer JW (2002) Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol* 23: 135-139.
34. Raetz CR, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71: 635-700.
35. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, et al. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 8: 217-225.
36. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Ulmer AJ, Holst O, et al. (1993) The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology* 187: 169-190.
37. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, et al. (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458: 1191-1195.
38. Tross D, Klinman DM (2008) Effect of CpG oligonucleotides on vaccine-induced B cell memory. *J Immunol* 181: 5785-5790.
39. Tamayo R, Ryan SS, McCoy AJ, Gunn JS (2002) Identification and genetic characterization of PmrA-regulated genes and genes involved in

- polymyxin B resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* 70: 6770-6778.
40. Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI (2004) 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 279: 20044-20048.
  41. Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, et al. (2001) Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 167: 5067-5076.
  42. Gunn JS, Belden WJ, Miller SI (1998) Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Microb Pathog* 25: 77-90.
  43. Gray D (1993) Immunological memory. *Annu Rev Immunol* 11: 49-77.
  44. Monack DM, Mueller A, Falkow S (2004) Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* 2: 747-765.
  45. Srinivasan A, Nanton M, Griffin A, McSorley SJ (2009) Culling of activated CD4 T cells during typhoid is driven by *Salmonella* virulence genes. *J Immunol* 182: 7838-7845.
  46. Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC (2009) Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 9: 845-857.
  47. Cigana C, Curcuru L, Leone MR, Ierano T, Lore NI, et al. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PLoS One* 4: e8439.
  48. Hoebe K, Janssen E, Beutler B (2004) The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5: 971-974.
  49. Brodsky IE, Medzhitov R (2009) Targeting of immune signalling networks by bacterial pathogens. *Nat Cell Biol* 11: 521-526.
  50. Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, et al. (2009) Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med* 15: 34-41.